

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06371

研究課題名(和文) 幼少期のストレス経験が成体の行動を変容させる：外側手綱核と不安・うつ

研究課題名(英文) Early-life stress experiences alter adult behavior: the lateral habenula and anxiety and depression.

研究代表者

一條 裕之 (Ichijo, Hiroyuki)

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：40272190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期LHbの脆弱性を検討するために、PV mRNA転写細胞をEGFPによって標識するマウスを作製し、PV発現の動態を検討した。PV発現は動的で、P16にかけて転写翻訳が増大した。P23以降に転写は減少するが、PV-proteinの発現は維持された。P60のPV-EGFP陽性細胞の $9.14 \pm 4.69\%$ がPV-proteinを発現しており、PV-protein陽性細胞の $58.85 \pm 1.98\%$ がPV-mRNAを発現していた。P16に転写・翻訳が極大を示し、P23以降に転写が減少する発現履歴は、経験に依存して成体が行動変容する段階と一致した。PVの発現がLHbの成熟に関与することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光遺伝学的な神経回路機能の検討は広く行われている。本研究ではPV mRNAを転写した細胞をEGFPによって標識するPV-EGFPマウスを作製することで、PV発現の履歴を明らかにした。PVの発現は動的で、PV-EGFP陽性細胞の中にはPV-proteinの発現を止めた細胞が存在した。PV-creを利用した実験では、PV-protein陰性の細胞を操作するおそれがあり、PVの転写(PV-mRNA)、翻訳(PV-protein)と履歴(PV-EGFP)からPV neuronの発現の動態を考慮した適切な実験の必要性を示した学術的影響は大きい。本研究は適切な方法を利用した研究を促進する社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the vulnerability of juvenile LHb, we generated mice in which PV mRNA-transcribed cells were labeled by EGFP and examined the dynamics of PV expression. PV expression increased its transcription and translation towards P16; transcription decreased after P23, but PV-protein expression was maintained at P60. The expression history of PV showed a transcriptional and translational maximum at P16 and a transcriptional decrease from P23 onwards, consistent with the stages of the experience-dependent alteration of adult behaviors, suggesting that PV expression is involved in LHb maturation.

研究分野：神経科学

キーワード：外側手綱核 Parvalbumin 臨界期 幼少期ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

外側手綱核 (lateral habenular nucleus, LHb)は、間脳背側に位置し、ストレスや嫌悪刺激といった情報を基底核や辺縁系から受け、腹側被蓋野 (Ventral tegmental area: VTA) や背側縫線核 (dorsal raphe nucleus: DRN) などの中脳のモノアミン系神経回路を調節し、認知・情動機能と行動に關与する神経核である。ヒトのうつ患者では、LHb の過活動が報告されている。げっ歯類の不安・うつ動物モデルにおいて LHb の過活動が見られ、GABA agonist を投与して LHb を抑制すると症状の改善が認められている。この結果は「不安とうつ」の発症におよぼす LHb の過活動の關与を示唆する。

申請者らは、マウスの LHb の成熟過程を神経細胞活動性マーカー (最初期遺伝子 Zif268/Egr1) と、神経細胞可塑性マーカー (PV と perineuronal nets: PNNs) を用いて記載し、成熟が4段階を経る

ことを示した。さらに、ストレスに対する脆弱性が成熟段階によって異なることを明らかにし (Fig. 1), 第2段階 (生後10-20日) に母子分離ストレスを毎日繰り返して与えた個体 (repeated maternal deprivation: RMD) で

は、成長後 (P60~80) に LHb の PV 陽性神経細胞が少なく、ストレスによって誘発される LHb の神経細胞活動性が高く、不安とうつ様行動を呈する事を示した (Fig. 2)。

これまでに幼少期ストレスが長期にわたる影響を有し、成長後の行動に影響及ぼすことを、LHb の神経回路に着目して研究しているグループは他になかった。特定の成熟段階における経験に依存して、PV 陽性神経細胞の減少と、ストレス反応性の亢進と、不安・うつ様行動の発現の因果関係はまだ明らかではなく、神経回路機構は解明されていない。

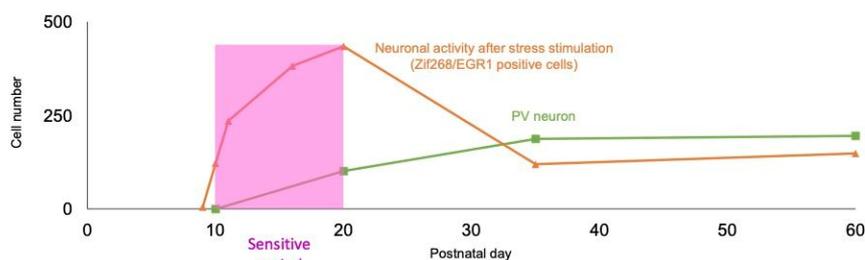


Fig. 1

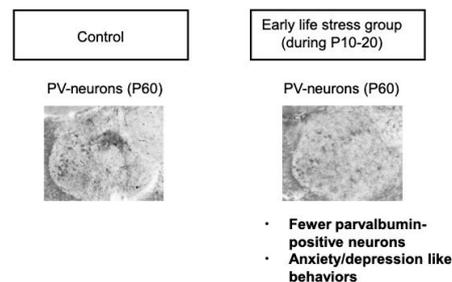


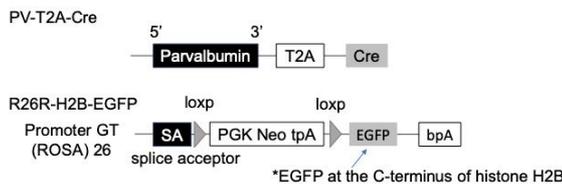
Fig. 2

### 2. 研究の目的

LHb の PV 陽性神経細胞の多様性と機能を明らかにする事を通じて、幼少期の経験に依存して成体に不安・うつ様行動が引き起こされる神経回路機構を解明する意義は大きい。PV 陽性神経細胞の神経回路機構を検討するために PV-cre を用いた遺伝子操作と、化学遺伝学的または光遺伝学的操作が広く行われている。他方で、LHb-PV 陽性細胞の多様性を Webster らが指摘しており、PV-cre による操作が生体内の PV 陽性細胞の機能をどの程度に反映するか不明の点がある。本研究は PV 陽性神経細胞の多様性を確認するとともに、その知識に基づいた操作を利用して、PV 陽性細胞が経験依存的に発症する「不安とうつ」に關与する神経回路機構を明らかにすることを目的として計画した。

### 3. 研究の方法

PV mRNA の発現を mRNA in situ hybridization chain reaction (mRNA in situ HCR)によって標識した。PV protein の発現を免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) で標識した。さらに、1回のPV-creの発現によってEGFP が核内で持続的に発現させることでPV の発現履歴を標識する PV-EGFP マウスを、PV-T2A-Cre マウスとR26R-H2B-EGFP マウスの交配によって作製した (Fig. 3)。これらの方法を利用して、PV の転写と翻訳の発現動態と発現履歴を、LHb-PV 陽性神経細胞において検討した。PV-T2A-Cre は化学遺伝学的または光遺伝学的操作を行う際に広く利用され、神経回路機能の操作の特異性の基礎を明らかにした。



In PV-EGFP-positive cells, EGFP is continuously expressed in the nucleus by at least once PV-cre expression (Madisen et al., 2009; Abe et al., 2011).

Fig. 3

#### 4. 研究成果

P10 において、LHb では PV-mRNA 陽性細胞と PV-protein 陽性細胞はほとんど観察されなかったが、PV-EGFP 陽性細胞がすでに出現していた。日齢の進行につれて、PV-protein 陽性細胞と PV-EGFP 陽性細胞の密度が増大し、P16 以降は増大が止まった。P16 において PV-mRNA を有する PV-protein 陽性細胞は多く、その割合は P23 および P60 よりも有意に高かった。PV の発現開始は P10 以前に始まり、P16 にかけて PV-mRNA 転写と PV-protein 翻訳が増大する。P23 以降に PV-mRNA の転写は減少するが、PV-protein の発現はプラトーとなり維持された。P16 に PV の転写と翻訳が極大を示し、P23 以降に転写が減少し、PV 発現が維持されるという LHb における PV 発現の履歴は、経験に依存した LHb の改変と成体の行動の変容を引き起こす段階と一致した。P60 の LHb の PV-EGFP 陽性細胞の  $9.14 \pm 4.69\%$  が PV-protein を発現しており、PV-protein 陽性細胞の  $58.85 \pm 1.98\%$  が PV-mRNA を発現していた。LHb の PV-mRNA 陽性細胞率は皮質と扁桃体に比して有意に大きく、LHb における PV の発現は他の脳部位に比して高度に動的であると考えられる (Fig.4)。

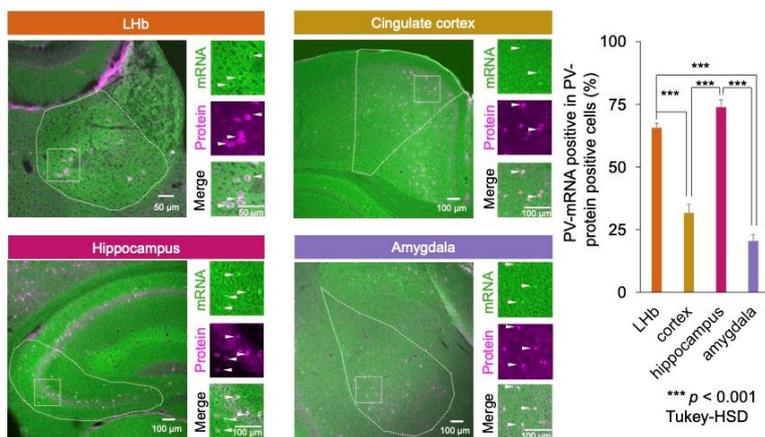


Fig. 4

さらに、PV-EGFP 陽性細胞密度に違いはなかったが、前方に比して後方の LHb における PV-mRNA 陽性細胞密度が有意に大きく、LHb 内において PV 発現のダイナミクスが異なると考えられる (Fig. 5)。

PV-EGFP 陽性細胞の中には PV-protein の発現を止めた細胞が存在し、そのため PV-cre を利用して光受容体などを発現させたマウスを利用する場合、PV-protein 陰性の細胞を操作するおそれがある。

PV-cre マウスでジフテリア毒素受容体を利用した LHb の PV 陽性神経細胞除

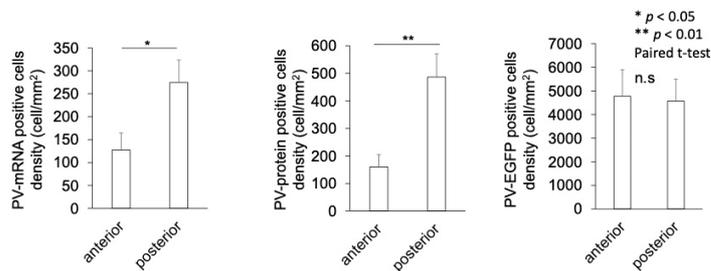


Fig. 5

去と、光遺伝学的な可逆的操作による PV 陽性神経細胞を操作する手技を利用した研究はこれま

で行われているが、私達の実験系において神経回路機構を解析するうえでは不適切であった。当初の研究を行うことはできなかったが、本研究は詳細な記載によって、P16 に PV の転写と翻訳が極大を示し、P23 以降に転写が減少し、PV 発現が維持されるという LHb における PV 発現の履歴が、経験に依存した LHb の改変と成体の行動の変容を引き起こす段階と一致することを示し、PV の発現制御が LHb の成熟機構に関与することを示唆した価値がある。

すなわち、transgenic マウスでは遺伝子の異所発現があるということが知られており、PV-cre マウスにおいてもその疑いがある。PV-EGFP マウスの LHb を anti-cre antibody と anti-PV antibody で免疫染色し、cre と PV-protein 発現の一致率を求めた。LHb において、cre 陽性細胞のうち  $96.61 \pm 1.41\%$  が PV 陽性であり、LHb において異所発現はほとんどないと考えられた。この調査を他の脳領域でも進め、比較し、PV-cre マウスと PV-EGFP マウスの有効性を確認することができよう。次に、PV-EGFP、PV-protein と PV-mRNA の発現を調査する日齢を増やし、PV-protein の PV-EGFP 細胞における陽性率、PV-mRNA の PV-protein 細胞または PV-EGFP 細胞における陽性率を測定する。また、他の脳部位（皮質、扁桃核、海馬）でも同様の調査を進め、比較する。PV-EGFP マウスにおいて、PV-EGFP 陽性細胞は PV の発現能を有する神経細胞であると考えられる。PV-protein 陽性細胞の PV-EGFP 細胞における割合（PV-protein/PV-EGFP）は PV を発現する確率と考えられる。変数を仮定して、PV 発現モデルを作製し、幼少期と成体の PV 発現確率のシミュレーションを進めている。体系的な計算を行い、PV 発現過程の計算値が実測値に近似する変数セットを同定し、実測値の背後にある変数を推定し、比較の結果をフィードバックして、モデルを再検討し、シンプルで近似度が大きいモデルを選択することが可能である。本研究の基礎データは、PV 発現動態の機構と経験に依存した行動の変容に影響する機構の基礎と発展の道筋を照らし出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura, T., Kurosaki, K., Kanemoto, M., Sasahara, M., & Ichijo, H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Early-life experiences altered the maturation of the lateral habenula in mouse models, resulting in behavioural disorders in adulthood.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatry and Neuroscience	6. 最初と最後の頁 E480-E489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1503/jpn.200226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村友也, 黒寄恒平, 兼本宗則, 一條裕之
2. 発表標題 幼少期ストレスは外側手綱核の成熟の変化と成長後の行動障害を引き起こす
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一條裕之, 兼本宗則, 笹原正清, 中村友也
2. 発表標題 ストレスに反応する神経回路の個体差; レンズ核下拡大扁桃体のZif268/Egr1陽性神経細胞クラスター
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回 日本生理学会大会・合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nguyen T, Nakamura T, Ichijo H
2. 発表標題 Identification of the agonistic character of PV-positive neurons in LHB by in-situ hybridization chain reaction (in-situ HCR)
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen VT, Nakamura T, Ichijo H.
2. 発表標題 Glutamatergic parvalbumin positive neurons in the lateral habenular nucleus.
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masuya Y, Nakamura T, Nguyen VT, Kanemoto M, Ichijo H.
2. 発表標題 Sublenticular extended amygdalarZif268/Egr1-expressing neuronal cluster (SLEA-zNC)はcalbindin陽性神経細胞から構成される.
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 友也, Trang Thi Van Nguyen, 一條 裕之.
2. 発表標題 Parvalbumin(PV)-EGFPマウスにおける多くのPV-protein陰性PV-EGFP陽性細胞 ; 外側手綱核PV-proteinの非定常的な発現
3. 学会等名 第46回神経科学学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Trang Thi Van Nguyen, Tomoya Nakamura, Hiroyuki Ichijo
2. 発表標題 Parvalbumin-positive neurons in lateral habenula differ phenotypically from those in hippocampus, amygdala, and cortex.
3. 学会等名 第46回神経科学学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

成長後の心の状態を左右するストレス感受性の高い幼少の特定の時期を発見  
<https://www.u-toyama.ac.jp/news-education/32579/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 友也  (Nakamura Tomoya)  (70733343)	富山大学・学術研究部医学系・助教    (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------